

Title	Rapid Genetic Diagnosis With the Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction System for Cancer Micrometastasis
Author(s)	石井, 孝明
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46249
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 いし い たか あき
石 井 孝 明

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19764 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 8 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 名 Rapid Genetic Diagnosis With the Transcription-Reverse
Transcription Concerted Reaction System for Cancer Micrometastasis
(RNA 増幅システム TRC を用いた癌迅速遺伝子診断法の確立)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 門田 守人

(副査)

教 授 金倉 譲 教 授 野口眞三郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

近年の分子生物学的手法の進歩により、各種固形腫瘍において、従来の病理学的検索では検出されない微小転移が存在し、又、この微小転移の臨床的意義が報告されはじめている。我々はこれまで LightCycler を用いた RT-PCR 法による癌微小転移診断法を確立し、食道癌手術における臨床導入してきた。しかし、PCR 法を基盤にした遺伝子診断では、時間的制約と手技の煩雑さ、さらに、微妙な thermal cycler の温度変化にともなう増幅効率の変化等、日常検査として導入していくうえでの問題があるのも事実である。本研究では、全く新しい、RNA 増幅システムである、転写、逆転写協奏増幅法 (TRC、Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction) を導入し、より簡便で迅速な微小転移診断法を確立し、その臨床応用における有用性の検討を行なった。

〔 方法ならびに成績 〕

I、TRC 反応による癌微小転移診断法の確立。

消化器癌、乳癌、肺癌に特異的発現を示す CEA (Carcinoembryonic antigen) を標的とする微小転移診断法を確立した。CEA を増幅するために、CEA の塩基配列に特異的な、3 種類の検出 primer (Scissor probe、Anti-sense primer、Promoter primer) を設定し、この増幅 CEA を特異的に検出するための蛍光プローブ (INAF probe) を作成した。

II、基礎的検討：合成 CEA mRNA、胃癌細胞株、を用いて、TRC 法の検出感度、定量性、再現性を検討した。

- (1) Full-length CEA mRNA を合成し、希釈系列を作成した (0、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^7 copies)。TRC 法により検出感度を測定した。CEA mRNA = 100 copies の検出が可能であった。CEA mRNA の初期コピー数と TRC 反応時間は相関し、検量線が作成可能であった。
- (2) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 0、1、10、 10^2 、 10^3 個) を混入させ、RNA を抽出し、癌細胞の検出感度を測定した。1 個の MKN-45 cell の検出が可能であった。
- (3) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 0、1、10、 10^2 、 10^3 個) を混入させ、RNA を抽出し、TRC 法と RT-PCR 法によりそれぞれ測定した。結果は、検出感度、定量性とも同等であった。
- (4) 正常白血球細胞 (10^3 個) に胃癌細胞株 (MKN-45 細胞 10 個) を混入させ、RNA を抽出し、TRC と LightCycler

で各 5 回ずつ測定し、定量値の再現性を検討した。結果は、再現性もほぼ同等であった。

Ⅲ、臨床検体を用いた検討：胃癌切除リンパ節及び腹腔内洗浄液中の癌細胞の検出と臨床的意義。

(1) 胃癌手術時の摘出リンパ節を半割し、TRC 法と RT-PCR 法による転移診断を行なった。TRC と LightCycler の CEA 定量値に強い相関が見られ、TRC と LightCycler が臨床サンプルにおいても同等の定量性をもつことが示された。

(2) 検査に要する時間は、RT-PCR 法が全行程 170 分であるのに対し、TRC は 60 分で終了し、検査手技も簡便であった。

(3) 術前無治療の進行胃癌 60 例について、開腹時に採取した腹腔洗浄液より RNA を抽出し、TRC 法にて遺伝子診断を行なった。非癌手術症例の腹腔洗浄液においては全例 CEA mRNA は検出されなかった。一方、胃癌症例では、TRC 陽性群は、陰性群に比べ、深達度 (T)、腹膜播種 (P)、進行度 (Stage)、腹腔細胞診 (CY)、予後、腹膜再発において、有意に進行したもの、不良なものが多かった。

〔 総 括 〕

従来の LightCycler による RT-PCR を用いた癌遺伝子診断法と比較し、TRC を用いることにより、簡便で、迅速な転移診断が可能となった。又、TRC は、従来の RT-PCR 法と比較して、感度、定量性は、ほぼ同等であり、再現性も、同等以上であった。胃癌開腹時の腹腔洗浄液診断において、TRC 診断は、予後、腹膜再発予測に有用であることが示された。

TRC の迅速性と簡便性は、遺伝子診断の日常検査への応用、特に、術中転移診断への応用を可能にするものである。将来、本診断に基づく適確な術式の選択が可能となれば、癌治療成績の向上につながるものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

近年、分子生物学的手法の進歩により、従来の病理学的検索では検出されない微小転移が検出されるようになり、この臨床導入が期待されている。しかし、これまでの、RT-PCR を基盤にした遺伝子診断では、時間的制約や手技の煩雑さ等、臨床検査として導入していくうえで問題がある。本研究では、新しい、RNA 増幅システムである、転写、逆転写協奏増幅法 (TRC、Transcription-Reverse transcription Concerted Reaction) を導入し、より簡便で迅速な微小転移診断法を確立することを目的とした。

基礎的検討：CEA mRNA を TRC により増幅検出する微小転移診断法を確立するため、合成した CEA mRNA、胃癌細胞株 MKN-45、胃癌転移リンパ節を用いて、TRC の検出感度、定量性、再現性を検討した。従来の RT-PCR を用いた癌遺伝子診断法では 170 分を要したが、TRC 導入により 60 分で癌遺伝子診断が可能となった。TRC は、従来の RT-PCR 法と比較して、検出感度、定量性、再現性も同等であった。

臨床的検討：胃癌リンパ節を用いた TRC 診断で、病理診断陽性例は全例 CEA mRNA が検出された。病理診断陰性例に CEA mRNA が検出された例があり、微小転移が存在した可能性が示唆された。胃癌腹腔洗浄液を用いた癌微小転移診断を行い、TRC の臨床的意義を検討した。胃癌腹腔洗浄液を用いた TRC 診断は、予後、腹膜再発の予測に有用であった。

TRC を用いることにより、簡便で、迅速な癌微小転移診断が可能となった。本研究は、遺伝子診断の日常検査への応用、特に、術中転移診断への応用を可能にするものである。将来、本診断に基づく適確な術式の選択が可能となり、癌治療成績の向上に寄与することが期待される。よって、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。